Lebensfähige Halobakterien aus permischem Steinsalz – und im Weltraum?

H. STAN-LOTTER, S. FENDRIHAN, A. LEGAT, M. PFAFFENHUEMER, C. GRUBER & G. WEIDLER

Abstract: **Viable halobacteria from Permian rock salt – and in outer space?** Viable halobacteria (also called haloarchaea) were isolated from Permian rock salt in the alps and in England, cultivated in nutrient media and characterized using biochemical, microscopical and molecular methods. Several properties of the isolates were similar to those of known haloarchaea; however, numerous differences suggested that the strains were novel species. These microorganisms may have survived enclosed in the salt since the evaporation of ancient brines, which was before the appearance of the dinosaurs.

Halobacteria belong to the extremophilic microorganisms; they possess unusual properties, such as optimum growth at salt concentrations approaching saturation, striking red, pink or purple pigmentation, and possibly extreme longevity.

Extraterrestrial halite was discovered in meteorites from Mars and from the asteroids; evidence for salts was found on the Martian surface; in addition, measurements by the Galileo probe suggested the existence of salty brines on the Jovian moon Europa. Therefore the search for extraterrestrial life, which will be conducted in the 21st century by several space agencies, will also include the search for halophilic microorganisms.

Key words: Halobacteria, haloarchaea, salt deposit, long-term survival, extraterrestrial halite.

Einleitung

Im Laufe der Erdgeschichte gab es mehrmals massive Ablagerungen von Steinsalz (Halit, NaCl). Die größten davon datieren aus dem Kambrium (vor etwa 550 Millionen Jahren vor der Gegenwart) und danach aus dem Perm und der Trias, der Zeit vor 286 bis 213 Millionen Jahren. Dazwischen und auch noch in jüngerer Zeit lagerte sich immer wieder Salz ab, jedoch in geringerem Umfang. Im Kambrium sowie Perm und Trias wurden jeweils schätzungsweise 1,3 Millionen Kubik-Kilometer Steinsalz deponiert (ZHARKOV 1981), das entspricht etwa 1,5 x 10^{15} Tonnen.

Zur Zeit des Perms waren alle Kontinente der Erde zu einem einzigen Großkontinent, Pangäa genannt, vereinigt. Das heutige Mitteleuropa lag in dieser Zeit fast am Äquator. Das Klima war sehr trocken und windig; in den Landgebieten herrschten wüstenartige Bedingungen, was die Bildung von Salzablagerungen begünstigte. Diese entstanden in großen Becken, die mit dem offenen Meer durch Kanäle verbunden waren.

Vor etwa 100 Millionen Jahren begann die Aufspaltung von Pangäa; die Kontinente drifteten auseinander und gleichzeitig verschoben sie sich nach Norden. Daher sind die geologisch alten Salzablagerungen heute vorwiegend in den nördlichen Regionen der Kontinente zu finden, so in Sibirien, in Nord- und Zentraleuropa, wo sich das sogenannte Zechsteinmeer befunden hatte, in den Alpen und Karpathen (dem ehemaligen Alpinen Becken), in Texas und New Mexico, in Grönland und im arktischen Gebiet von Kanada.

Die alpinen Salzsedimente wie auch die Zechstein-Ablagerungen in England, Nord- und Mitteldeutschland entstanden im späten Perm bzw. der frühen Trias. Nach der Trias fanden im alpinen Raum keine signifikanten Salzsedimentationen mehr statt, da sich durch die Auffaltung der Alpen keine großen Verdunstungsbecken mehr bilden konnten; in anderen Gegenden, zum Beispiel in Osteuropa, gab es weiter Salzablagerungen durch das vorhandene Tethys-Meer bis ins Miozän (vor etwa 20 Millionen Jahren). Die alpinen Salzsedimente wurden mit der Faltung der Bergketten nach oben geschoben und sind heute in Höhen von 500 bis 1200 Metern zu finden, überlagert von Schichten aus Ton, Sand- und Kalkstein, welche das Auswaschen des Salzes verhinderten.

Salzablagerungen entstehen heutzutage bei der Verdunstung von hypersalinen Oberflächengewässern in den wärmeren Gegenden der Erde, entweder aus natürlichen Salzseen, wie dem Großen Salzsee in Utah, dem Toten Meer in Israel, Alkaliseen in Kenya und Ägyp-

Denisia **20**, zugleich Kataloge der oberösterreichischen Landesmuseen Neue Serie **66** (2007): 313-322



Abb. 1: Steinsalz-Klumpen aus einem Stollen im Bergwerk Bad Ischl-Perneck, erhalten nach Sprengung.



Abb. 2: Steinsalz-Bohrkerne aus dem Bergwerk Altaussee, aus ca. 700 m Tiefe stammend.

ten, oder aus Lagunen, wie z. B. in Salzgewinnungsanlagen, wo Meereswasser verdunstet wird. In diesen Gebieten sind die sogenannten Halobakterien zu finden, eine Gruppe von Mikroorganismen, die am besten bei hohen Salzkonzentrationen wachsen. Sie leben von den Zerfallsprodukten der beim Konzentrieren von Meereswasser abgestorbenen Arten. Ab Salzkonzentrationen von etwa 3-4 Molar (das entspricht etwa 15-22 % NaCl) sind Arten der Gattungen *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halococcus* und anderen die vorherrschenden Organismen. Halobakterien verleihen den Salzlaken eine auffallend rote Farbe aufgrund ihrer Pigmente, wie Karotin, Bakteriorhodopsin und Bakterioruberin, die in ihren Membranen vorhanden sind und die zum Teil eine Schutzfunktion gegenüber der starken Sonneneinstrahlung bewirken. Halobakterien können beim vollständigen Verdunsten der Salzsolen in die sich bildenden Kristalle eingeschlossen werden; sie sind dann noch an ihrer Farbe zu erkennen und, unter dem Mikroskop, an ihrer Beweglichkeit. Aus Laborexperimenten ist bekannt, dass Halobakterien, die in derartige Salzkristalle eingeschlossen wurden, mindestens 6 Jahre lebensfähig bleiben.

Aufgrund neuerer molekularer Untersuchungen wurden die Halobakterien von den klassischen Bakterien abgetrennt und in die Gruppe Archaebakterien (oder Archaea) eingereiht; dies sind Mikroorganismen, die vielleicht schon in der Frühzeit der Erde (z. B. im Archaikum, vor 2,5 Milliarden Jahren) existiert haben; statt der traditionellen Bezeichnung Halobakterien ist daher nun „Haloarchaea“ gebräuchlich geworden. Allerdings wird die für die Klassifizierung zutreffende Ordnung weiterhin mit „Halobacteriales“ bezeichnet und die (einzige) Familie in dieser Ordnung mit „Halobacteriaceae“ (GRANT et al. 2001); in diesem Artikel wird daher i.a. die Bezeichnung Halobakterien verwendet. Die ungewöhnlichen Eigenschaften der Halobakterien und ihre physiologischen und molekularen Anpassungen an die hohen Salzkonzentrationen sind in mehreren Büchern und Übersichtsartikeln ausführlich behandelt worden (z. B. JAVOR 1989; VREELAND & HOCHSTEIN 1993; OREN 2002; VENTOSA 2004; GUNDE-CIMERMAN et al. 2005; FENDRIHAN et al. 2006).

Steinsalz ist in Europa seit Jahrhunderten im Bergbau gewonnen worden, und bis heute wird es sowohl als festes Salz wie auch in gelöster Form als Sole erhalten, z. B. in den Salzbergwerken bei Berchtesgaden, Bad Ischl und Altaussee. Von diesen Orten stammen die Proben, die unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit den Salzbergwerksbetreibern erhielt. Beim Vortrieb von neuen Stollen durch Sprengungen wie auch bei den Probebohrungen in Tiefen bis zu 700 Meter unter der Oberfläche kamen Steinsalzproben (Abb. 1, 2) nach Millionen von Jahren erstmals wieder ans Tageslicht.

Wir isolierten zahlreiche lebensfähige halophile Mikroorganismen aus altem Steinsalz, die wir näher charakterisierten, wie nachfolgend beschrieben wird. Die halophilen Isolate sind möglicherweise zur extremen Langlebigkeit im Trockenzustand befähigt; die Bedeutung dieses Befunds für die Beurteilung der physikalisch-chemischen Grenzen des Lebens sowie für die Suche nach extraterrestrischem Leben wird diskutiert.

Material und Methoden

Probennahme und -vorbereitung

Steinsalzbrocken aus dem Bergwerk bei Bad Ischl von etwa 1 kg Gewicht (Abb. 1) wurden nach Sprengungen erhalten, die untertage zum Vortrieb von neuen Stollen durchgeführt wurden; Bohrkerne aus ca. 600-700 m Tiefe wurden aus dem Bergwerk Altaussee unmittelbar nach der Gewinnung aus den Metallhülsen entnommen (Abb. 2). Im Labor wurden die Steinsalzproben rundherum mit einem Bunsenbrenner abgeflammt, um mögliche Mikroorganismen, die nachträglich durch das Hantieren auf die Oberfläche gelangt sein könnten, abzutöten. Das Salz wurde langsam mit sterilem Wasser aufgelöst; nach Zugabe von Nährstoffen wurden halophile Mikroorganismen in Flüssigmedien oder auf Agarplatten gezüchtet; die Inkubation erfolgte bei 37-40 °C für einige Wochen oder manchmal auch Monate; im letzteren Fall wurde die Inkubation nach ca. 6 Wochen bei Raumtemperatur weitergeführt.

Kulturmedien: *Halococcus*-Stämme wurden unter Schütteln auf einem Innova 4080 Schüttler in M2 Medium (TOMLINSON & HOCHSTEIN 1976) kultiviert; für *Halobacterium*-Stämme wurde statt M2 das ATCC Medium Nr. 2185 (http://www.lgcpromochem.com/atcc/) verwendet; beide Kulturmedien enthielten 3,8 bis 4 M NaCl. Wachstum wurde durch Messen der Optischen Dichte (OD) bei 600 nm verfolgt. Für Wachstumsversuche auf verfestigtem Medium wurden Platten mit den gleichen Kulturmedien hergestellt, die eine Endkonzentration von 2 % Agar enthielten.

Halobakterien-Vergleichsstämme

Von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) wurden *Halococcus dombrowskii* H4 DSM14522^T, *Halobacterium salinarum*, Stämme DSM670 and DSM3754^T erhalten. *Halobacterium salinarum* NRC-1 ATCC700922 (siehe GRUBER et al. 2004 zur Reklassifizierung) stammte vom ATCC-Verteiler LGC London, UK.

Klassifizierung und Charakterisierung

Neue Isolate wurden mittels 16S rRNA Gensequenzen identifiziert und Gattungen zugeordnet; die weitere Klassifizierung erfolgte durch Analyse der polaren Lipide und Chinone, Bestimmung des G+C Gehalts, Bestimmung von Enzymaktivitäten (API-Zym-Testsystem) und Antibiotika-Empfindlichkeit, Gesamtzellproteinmustern nach elektrophoretischer Auftrennung und gegebenenfalls DNA:DNA Hybridisierungsdaten; diese Methoden sind ausführlich beschrieben worden (DENNER et al. 1994; STAN-LOTTER et al. 1999, 2002; GRUBER et al. 2004). Für alle isolierten Stämme wurden die Wachstumsoptima bezüglich Temperatur, Ionenkonzentrationen (Na^+, Mg^{++}) und pH Werten bestimmt, sowie die Verwendung von Kohlenstoffquellen und Elektronenakzeptoren, die Hydrolyse von Gelatine, Stärke, Casein und Tween, wie es für die Klassifizierung von neuen Halobakterien-Stämmen empfohlen wird (OREN et al. 1997). Kolonie- und Zellmorphologie wurden bestimmt unter Verwendung von Licht- und Rasterelektronenmikroskopie (DENNER et al. 1994; STAN-LOTTER et al. 1999; GRUBER et al. 2004).

Phylogenetische Analyse

Der phylogenetische Stammbaum wurde konstruiert wie von RADAX et al. (2001) beschrieben, nachdem die Sequenzen der 16S rRNA Gene ausgerichtet, zum Teil manuell nachkorrigiert und anschließend mit dem Programmpaket PHYLIP version 3.5.1.c nach J. FELSENSTEIN 1993 (erhältlich vom Autor, Department of Genetics, University of Washington, Seattle) analysiert wurden.

Färbung und Fluoreszenzmikroskopie

Die Färbung von Halobakterien mit dem LIVE/DEAD® BacLight bacterial viability kit L-7012 (von Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) wurde von uns beschrieben (LEUKO et al. 2004); kurz gesagt wurden Zellen in TN Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 4 M NaCl) suspendiert und mit den Farbstofflösungen des Kits, SYTO 9 und Propidiumjodid, bei Raumtemperatur für 15 min in Dunkelheit inkubiert. Die Halobakterien wurden im Fluoreszenzmikroskop (Axioskop von Zeiss) mit dem Filterset 25 (Zeiss) beobachtet. Das emittierte Licht wurde mittels CCD Kamera (Optronics DEI-750CE) aufgenommen und mit der Zeiss Software KS-200 dokumentiert.

Einbettung in künstlichen Halit

Halobakterien-Zellen wurden nach Erreichen einer OD von 0.9 (600 nm) durch Zentrifugation bei 5000 Upm für 20 min. geerntet, mit TN Puffer gewaschen und mit den Fluoreszenz-Farbstoffen des LIVE/DEAD kit gefärbt. Nach Ausstreichen der Zellsuspensionen auf Glas-Objektträgern wurden sie bei 37 °C 2-3 Tage in Dunkelheit inkubiert, um Austrocknung und damit Bildung von Halit-Kristallen zu erreichen. Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte wie oben beschrieben.

Abb. 3: Kolonien von Isolaten aus permischem Steinsalz nach Wachstum von 2-3 Monaten auf M2 Agar (TOMLINSON & HOCHSTEIN 1976). Durchmesser einer Kolonie ist ca. 1 cm.

Ergebnisse

Isolate aus Steinsalzproben und ihre Charakterisierung

Es kann oft Wochen oder sogar Monate dauern, bis sich Kolonienbildung aus dem aufgelösten Steinsalz auf den Agarplatten zeigt; die Kolonien sind meist intensiv rot, rosa oder orange gefärbt und zeigen unterschiedliche Formen und Oberflächenstrukturen, was auf unterschiedliche Arten von Mikroorganismen hinweist (Abb. 3; siehe auch STAN-LOTTER 2002).

Das erste Isolat, das wir aus Steinsalz erhielten, wurde *Halococus salifodinae* BIp genannt. BIp ist die Stammbezeichnung und steht für „Bad Ischl, pink". Die Zellen sind rundlich, von etwa 0,8 µm Durchmesser und wachsen meist in Tetraden, die zu größeren Aggregaten zusammengelagert sind (Abb. 4). Wir untersuchten Eigenschaften dieses *Halococcus*, z. B. die Zusammensetzung der Lipide und Proteine, die Nukleinsäuresequenzen der 16S ribosomalen RNA Gene, die als diagnostisch für die Bakterien- und Archaea-Klassifizierung angesehen werden, die Anwesenheit bestimmter Enzyme, die Empfindlichkeit auf gewisse Antibiotika, usw. Aus allen diesen Ergebnissen wurde klar, dass das Isolat den bisher bekannten *Halococcus*-Arten zwar ähnlich ist, aber doch so viele bis dahin unbekannte Eigenschaften aufwies, dass es als neue Art anzusehen ist (DENNER et al. 1994).

Obwohl dieser Mikroorganismus aus geologisch altem Material sich als neuartig erwies, war er zunächst nur ein Einzelisolat, und daher war der Einwand, dass es sich hier um ein Zufallsisolat, eventuell aufgrund einer Kontamination handeln könnte, nicht so leicht zu entkräften. Wir erhielten dann weitere Isolate, die so ähnlich aussahen wie Stamm BIp, jedoch aus anderen Gegenden stammten. Aus einem Bohrkern aus dem Bergwerk in Berchtesgaden hatte Professor Stetter von der Universität Regensburg ein kokkenförmiges halophiles Isolat schon im Jahre 1988 gewonnen, noch ehe wir mit unseren Untersuchungen begonnen hatten. Das Isolat hat die Bezeichnung BG2/2 bekommen. Ein weiterer Stamm, Br3 genannt, war von Terry McGenity und William Grant, Universität Leicester, aus einem Zechstein-Salzbergwerk in England isoliert worden. Alle drei Stämme sind Halokokken, mit Durchmessern von etwa 0,8 µm, und wachsen in Aggregaten, wie in Abb. 4 zu sehen; sie zeigten Ähnlichkeiten in der Pigmentierung, der Kolonie-Form und vielen anderen biochemischen und molekularen Merkmalen. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass in geographisch entfernten Salzablagerungen, die aus dem gleichen geologischen Erdzeitalter stammen, sehr ähnliche lebensfähige *Halococcus*-Arten vorkommen. Darüberhinaus konnten wir acht Jahre nach der ersten Probennahme im Salzbergwerk Bad Ischl nochmals einige neue Stämme aus Steinsalz isolieren, die sich als identisch mit *Halococcus salifodinae* BIp erwiesen (STAN-LOTTER et al. 1999). Alle Isolate waren unabhängig voneinander von verschiedenen Personen zu verschiedenen Zeiten gemacht worden; dies zeigte, dass die Isolierung von lebensfähigen Halokokken aus geologisch altem Steinsalz reproduzierbar ist. Die Ergebnisse sind zumindest kompatibel mit der Vorstellung, dass die halophilen Kokken die Überreste von Mikroorganismen sein könnten, die schon vor Millionen von Jahren die hypersalinen Meere bewohnten.

Tab. 1: Halobakterien aus permischem Steinsalz und Salzsole.

Organismus, Stamm	Typenstamm (T), Katalognummern	Herkunft	Literatur
Halococcus salifodinae BIp	DSM8989^T ATCC51437^T JCM9578^T	Steinsalz (Klumpen), Bad Ischl, Österreich	DENNER et al. 1994
Halococcus salifodinae BG2/2	DSM13045	Salzbohrkern, Berchtesgaden, Deutschland	STAN-LOTTER et al. 1999
Halococcus salifodinae Br3	DSM13046	Salzsole, Bergwerk Cheshire, England	STAN-LOTTER et al. 1999
Halococcus salifodinae N1	DSM13070	Steinsalz (Klumpen), Bad Ischl, Österreich	STAN-LOTTER et al. 1999
Halococcus salifodinae H2	DSM13071	Steinsalz (Klumpen), Bad Ischl, Österreich	STAN-LOTTER et al. 1999
Halococcus dombrowskii H4	DSM14522^T NCIMB13803^T	Steinsalz (Klumpen), Bad Ischl, Österreich	STAN-LOTTER et al. 2002
Halobacterium noricense A1	DSM15987^T NCIMB13967^T	Salzbohrkern, Altaussee, Österreich	GRUBER et al. 2004

Ein weiteres neueres Isolat aus Steinsalz, das wir beschrieben haben (STAN-LOTTER et al. 2002), wurde *Halococcus dombrowskii* genannt, nach dem Arzt Heinz Dombrowski, der schon um 1960 über die Isolierung von lebensfähigen *Bacillus*-Arten aus Zechsteinsalz berichtet hatte (DOMBROWSKI 1963). Dieser Stamm unterscheidet sich etwas von den sonstigen *Halococcus*-Arten; er wächst bevorzugt als Diplokokken in kleinen Aggregaten (Abb. 5).

Halococcus salifodinae und *H. dombrowskii* sind bis jetzt noch nicht in hypersalinen Oberflächengewässern gefunden worden, oder in irgend welchen anderen Orten außer Salzbergwerken. Kürzlich haben wir eine Reihe von nicht-kokkoiden Halobakterien aus einem frischen Bohrkern aus dem Bergwerk in Altaussee isoliert. Die Stämme waren aufgrund ihrer 16S rRNA Gensequenzen der Art *Halobacterium salinarum* NRC-1 sehr ähnlich, dem ersten Halobakterium, dessen gesamte Genomsequenz publiziert wurde (NG et al. 2000); andere Eigenschaften waren jedoch unterschiedlich, insbesondere die Phospholipid-Zusammensetzung und die Gesamtzellproteinmuster. Daher wurden diese Isolate als neue Art identifiziert und mit *H. noricense* benannt (GRUBER et al. 2004). Abb. 6 zeigt die stäbchenförmigen *H. noricense* Zellen (rechts) und zum Vergleich die durchschnittlich etwas größeren Stäbchen von *H. salinarum* NRC-1 (Abb. 6, links). Tabelle 1 enthält die bisherigen offiziell klassifizierten Isolate aus alpinem permischen Steinsalz sowie einen Stamm aus einem englischem Zechsteinbergwerk, inklusive der Katalognummern, die sie nach Aufnahme in internationale Stammsammlungen erhielten (DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA; JCM: Japan Collection of Microorganisms, Hirosawa, Wako-shi, Japan; NCIMB: National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, Scotland, UK).

Abbildung 7 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum auf der Grundlage der 16S rRNA Gensequenzen. Daraus sind die Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate aus alpinem Steinsalz zu einigen bekannten Halobakterien ersichtlich. Die Halokokken aus Steinsalz sind dem Ast zuzuordnen, der auch die bekannten Stämme *Halococcus morrhuae* (welcher ursprünglich aus gesalzenem Fisch isoliert wurde) sowie *H. saccharolyticus*, der aus Salz vom Mittelmeer stammt, enthält; sie bilden jedoch deutliche eigenständige Linien. *Halobacterium noricense* ist dem Ast der *Halobacterium*-Arten zuzuorden und ist verwandt mit Stämmen von *H. salinarum* (aus gesalzener Rinderhaut bzw. gesalzenem Fisch isoliert) sowie *Halobacterium* sp. BpA.1, der ebenfalls aus permisch-triassischem Steinsalz (Salzbergwerk Boulby, England) stammt, jedoch noch nicht näher charakterisiert wurde (MCGENITY et al. 2000).

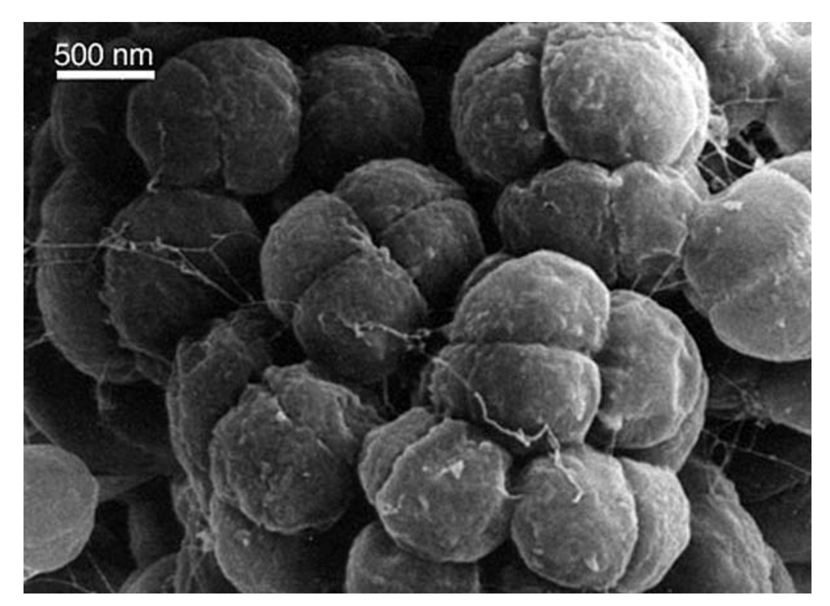


Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Halococcus salifodinae*-Zellen. Mehrere Stämme dieser Halobakterien-Art wurden aus alpinem Steinsalz (von den Bergwerken Bad Ischl und Berchtesgaden) isoliert, außerdem auch aus Zechsteinsalz in England.

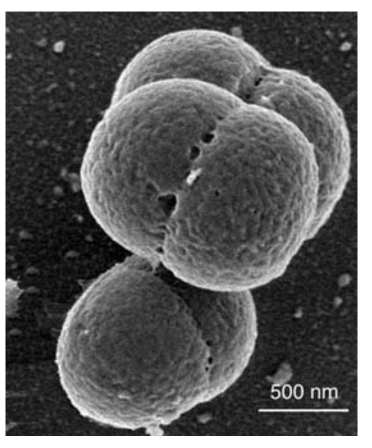


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Halococcus dombrowskii*, einem Isolat aus permischem Steinsalz.

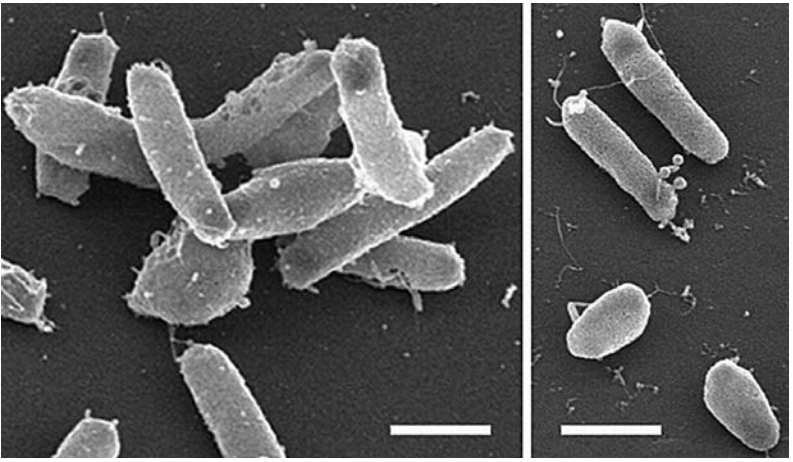


Abb. 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Halobacterium noricense* (rechts), einem stäbchenförmigen Isolat aus permischem Steinsalz, und von der verwandten Art *Halobacterium salinarum* NRC-1 (links). Balken, 1 μm.

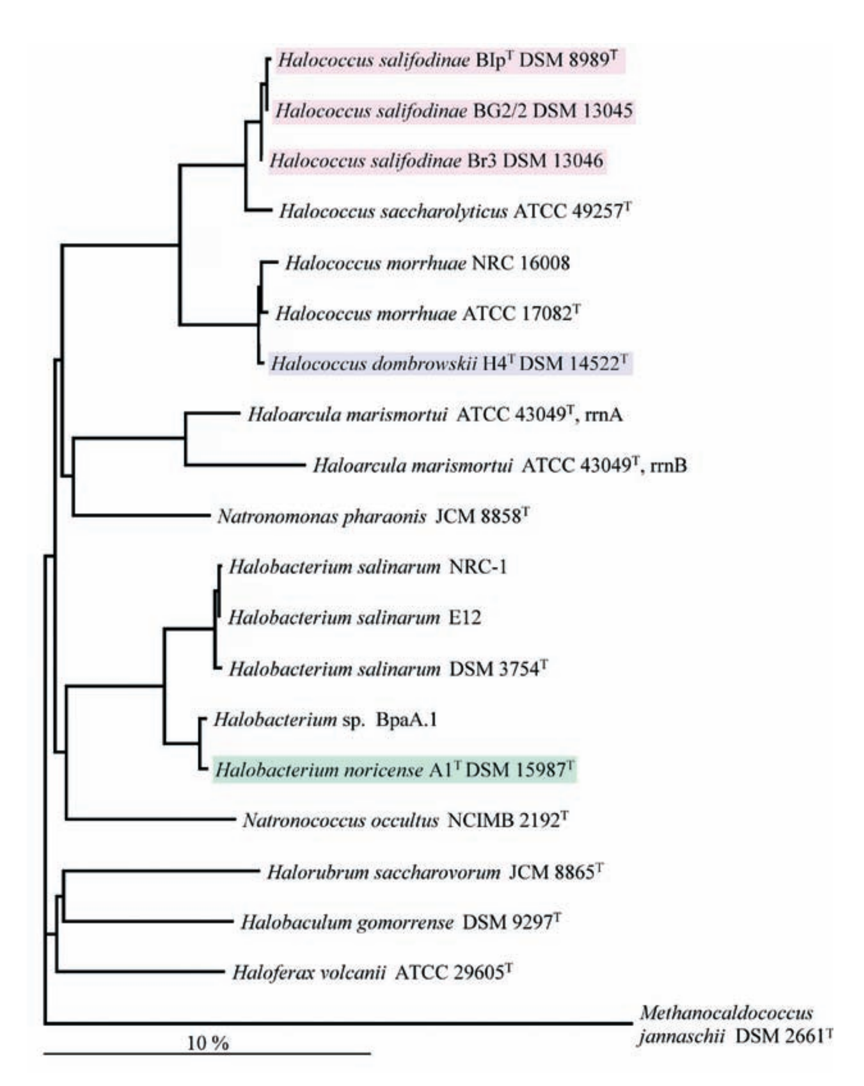


Abb. 7: Phylogenetischer Stammbaum, auf Sequenzen der 16S rRNA Gene basierend, der die Beziehungen von Halobakterien-Isolaten aus permischen Steinsalz (farbig unterlegt) zu anderen Halobakterien-Arten zeigt. Die Artnamen sind aufgeführt, gefolgt von Katalognummern. Der Balken repräsentiert 10 % Sequenzunterschiede. *Methanocaldococcus jannaschii* wurde als externe Referenz („outgroup“) benützt.

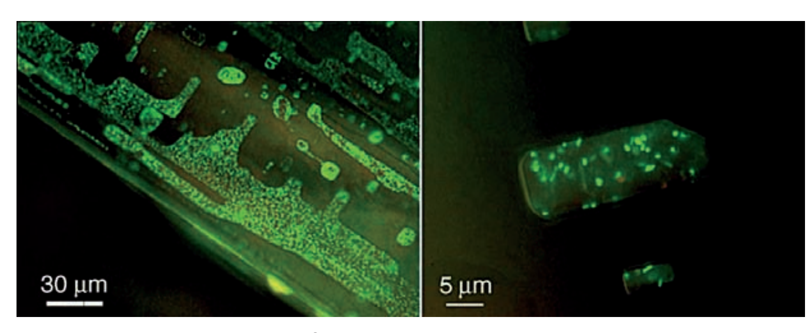


Abb. 8: Lokalisierung von gefärbten Halobakterien-Zellen in Flüssigkeitseinschlüssen von Halit-Kristallen. Die Färbung erfolgte mit dem LIVE/DEAD BacLight kit (siehe Methoden) vor dem Einbetten der Zellen in Salz. Niedrige (links) und höhere (rechts) Vergrößerung von *Halobacterium salinarum* NRC-1 Zellen, die 3 Tage in Flüssigkeitseinschlüssen eingebettet waren. Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Axioskop (Zeiss) durchgeführt.

Wir haben insgesamt etwa 60 verschiedene Kolonietypen von halophilen Mikroorganismen erhalten, die sich kultivieren lassen und die wir näher untersuchen. Darüberhinaus verwenden wir die molekularen Nachweismethoden, die auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruhen, mit deren Hilfe in Umweltproben, wie z. B. auch aufgelöstem Steinsalz, das Vorhandensein von Mikroorganismen gezeigt werden kann, ohne dass sie kultiviert werden. Mit der PCR haben wir bisher Hinweise für die Existenz von 123 Klonen (Halobakterien-Arten) erhalten, die sich in mindestens 12 verschiedene Gruppen ordnen lassen. Die Teilsequenzen von 16S rRNA-Genen erlaubten die Zuordnung zu bekannten Halobakterien; jedoch war keine der neu gefundenen Sequenzen identisch mit bisher beschriebenen Sequenzen (RADAX et al. 2001; STAN-LOTTER et al. 2003). Dies zeigte, dass im Steinsalz mit großer Wahrscheinlichkeit eine Vielzahl von noch unbekannten Arten vorhanden ist.

Lokalisierung in Flüssigkeitseinschlüssen

Es ist nicht bekannt, ob Mikrorganismen in Sedimenten in den Mineralien oder in den winzigen Flüssigkeitseinschlüssen überleben, die sich in Halit bilden und die konzentrierte Salzlösungen enthalten (ROEDDER 1984). Um die Lokalisierung der Halobakterien in Salzkristallen zu bestimmen, wurden die Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen (LIVE/DEAD kit) angefärbt, in salzhaltigem Puffer bis zum Eintrocknen stehen gelassen (2-3 Tage) und dann mikroskopiert. Abbildung 8 zeigt die für Halit typischen kubischen oder rechteckigen Flüssigkeiteinschlüsse, die mit grün fluoreszierenden Halobakterien-Zellen angefüllt erscheinen; in etwas höherer Vergrößerung (Abb. 8, rechts) sind einzelne Zellen, die Längen von ca. 1 bis 3 µm aufweisen, deutlich zu erkennen. Der grün fluoreszierende Farbstoff SYTO 9 färbt lebensfähige Zellen; Propidiumjodid dagegen dringt in Zellen mit beschädigten Membranen ein und daher ist rote Fluoreszenz ein Zeichen für nicht-lebensfähige Zellen (siehe LEUKO et al. 2004).

Die Herstellung des „künstlichen“ Halits mitsamt den Flüssigkeitseinschlüssen ist eine Simulierung der natürlichen Eindunstungsvorgänge; es lässt sich aus der Verteilung der Fluoreszenz (Abb. 8) schließen, dass Mikroorganismen vorwiegend oder vielleicht sogar ausschließlich in den Flüssigkeitseinschlüssen von Halit-Kristallen zu finden sind, und dass sie, jedenfalls während des Beobachtungszeitraums im Labor, in den Flüssigkeitseinschlüssen lebensfähig bleiben.

Diskussion

Wie alt sind die Halobakterien aus Steinsalz?

Das pflanzliche und tierische Leben in Kambrium, Perm und Trias ist aufgrund vieler Fossilienfunde gut dokumentiert. Über mikrobielles Leben in diesen Zeiten ist allerdings wenig bekannt. Mikroorganismen sind mit dem freien Auge nicht sichtbar, und daher ist die eindeutige Identifizierung von Mikrofossilien viel schwieriger als die von größeren Fossilien. Aus den Abdrücken von Bakterien und anderen einfachen Lebensformen in der Größe einiger Mikrometer ergeben sich allenfalls Vorstellungen über die Morphologie, aber es können kaum sonstige Aussagen gemacht werden. Dennoch gibt es viele Hinweise, dass Mikroorganismen bereits vor 3,5 bis 3,8 Milliarden Jahren existiert haben, und dass sie seit damals, wie auch heute, mit Sicherheit überall vorhanden waren.

Es gibt zahlreiche neuere Berichte von der Existenz einer reichhaltigen „unterirdischen" Biosphäre; damit sind lebensfähige Mikroorganismen gemeint, die man in großen Tiefen in Gesteinen, Sedimenten und Aquiferen gefunden hat (FREDRICKSON & ONSTOTT 2002). Auch diese unterirdischen Mikrobenfunde werfen die Frage auf, ob sie genauso alt sein können wie ihre Umgebung – das gleiche Problem, wie es bei den aus Steinsalz isolierten Halobakterien vorliegt. Eine direkte Altersbestimmung ist bei Mikroorganismen schwierig, da meist nicht sehr viel Zellmaterial vorhanden ist. Wenn gar nur ein einzelnes Isolat vorliegt, ist die Aufgabe derzeit nicht zu lösen, denn die Masse einer durchschnittlichen Bakterien- oder Archaea-Zelle beträgt nur etwa ein Picogramm (10^{-12} g); das ist zu wenig für Datierungsmethoden.

Andrerseits gibt es weltweit anerkannte und auch präzise Datierungen von Sedimenten und Evaporiten. Zur Bestimmung des Alters von Steinsalzablagerungen wurden hauptsächlich Schwefelisotopen-Messungen und palynologische Analysen angewandt. Die massenspektrometrische Bestimmung des Verhältnisses von S^{32} zu S^{34} Isotopen, das für geologische Proben charakteristisch ist, ergab eindeutig, dass die alpinen Salzsedimente dem späten Perm bzw. der frühen Trias zuzuordnen sind (PAK & SCHAUBERGER 1981). Die zweite Methode erfordert Pollen- oder Sporenfunde von ausgestorbenen Pflanzen, die nach morphologischen Kriterien identifiziert werden und, zusammen mit stratigraphischen Informationen, geologischen Zeitabschnitten zugeordnet werden. In den 50er und 60er Jahren wurden von dem Wiener Paläontologen Professor Wilhelm Klaus umfangreiche palynologische Untersuchungen durchgeführt. Er identifizierte mehrere Sporentypen aus permischem alpinen Steinsalz und fand einige der gleichen Arten auch im norddeutschen Zechsteinsalz, z. B. Sporen der Gattung *Lueckisporites*. Die Sporenart *Gigantosporites hallstattensis* dagegen scheint charakteristisch für permische alpine Regionen zu sein und kommt u. a. im Hallstätter Salz vor (KLAUS 1963).

Vergleich von Halobakterien aus Steinsalz mit Isolaten aus Oberflächenwässern

Die phylogenetische Analyse (Abb. 7) zeigt, dass einige der Halobakterien aus altem Steinsalz sich in bekannte Gattungen der Familie Halobacteriaceae einordnen lassen. Es gab Versuche, aus den Ähnlichkeitswerten von 16S rRNA Sequenzen die Kalibrierung einer „molekularen Uhr" zu berechnen, z. B. sollten 1,5 Nukleotid-Substitutionen pro 100 Basen einer Zeitspanne von 50 Millionen entsprechen; dies war aus der Ko-Evolution von Aphiden und ihren bakteriellen Endosymbionten abgeleitet worden (MORAN et al. 1993). Jedoch sind diese Betrachtungen umstritten, da es auch Beispiele vom Vorhandensein mehrerer 16S rRNA Gene in einem einzigen Halobakterium gibt (GEMMELL et al. 1998; VREELAND et al. 2002) die Sequenzunterschiede bis zu 5 % zeigen können. Evolutionäre Kalibrierungsversuche müssten daher vermutlich mit anderen Genen versucht werden.

Sonstige Halobakterien-Isolate aus Steinsalz sind deutlich entfernter verwandt mit bekannten Gattungen (siehe MCGENITY et al. 2000; RADAX et al. 2001); dies heißt jedoch nicht, dass solche Arten – oder ähnliche Vertreter – nicht in jetzigen Oberflächengewässern vorkommen, sondern nur, dass bis jetzt nicht hinreichend bekannt ist, ob sie dort existieren.

Überlebensstrategien

Wie aus den Ausführungen hervorgeht, ist es wahrscheinlich, dass Halobakterien über sehr lange Zeiträume in Steinsalz überleben können; vermutlich innerhalb von Flüssigkeitseinschlüssen. Es ist nicht bekannt, ob sie sich dabei in einer Art Dauerform befinden. Halobakterien – und überhaupt Archaea – sind keine Sporenbildner; allerdings sind manchmal zystenähnliche Strukturen von Halobakterien beschrieben worden (siehe GRANT et al. 1998). Die DNA der Halobakterien könnte durch hohe Konzentrationen von Kationen gegen Abbau geschützt sein, wie aus Laborexperimenten geschlossen werden kann (MARGUET & FORTERRE 1998). Ein äußerst langsamer Stoffwechsel der Halobakterien zur Aufrechterhaltung von Reparaturfunktionen wird von manchen Forschern vorgeschlagen (siehe MCGENITY et al. 2000); die nötigen Energiequellen könnten von Spuren organischer Materie im Salz stammen unter der Annahme, dass – über geologische Zeitspannen – Flüssigkeitseinschlüsse wandern, und die Halobakterien mit ihnen, sodass ihnen neue Substrate zugänglich sind.

Tab. 2: Halit im Weltraum.

Name/Herkunft	Methode/n	Literatur
Meteoriten		
Nakhla + andere SNC (vom Mars)	EM[a], Infrarotspektrometrie	GOODING (1992)
Murchison (+ andere)	EM[a], Röntgenanalyse	BARBER (1981)
Monahans (Asteroid)	Ramanspektrometrie	ZOLENSKY et al. (1999)
Zag (Asteroid)	EM[a]; RELAX[b]	WHITBY et al. (2000)
Mond		
Europa (Jupitermond)	Infrarotspektrometrie	MCCORD et al. (1998)
Marsoberfläche		
Spirit, Opportunity	Mikroskopie, Röntgenanalyse	www.msnbc.msn.com/id/4582649/

[a] (analytische) Elektronenmikroskopie
[b] „Ultrasensitive resonance ionization mass spectrometer for Xenon"

Die Suche nach extraterrestrischem Leben

Mehrere Raumfahrtbehörden, wie die National Aeronautics and Space Agency (NASA) in USA und die European Space Agency (ESA), haben die Suche nach Leben im Weltraum als eines ihrer wichtigsten Ziele erklärt. Wie das Leben auf der Erde entstand, wissen wir bis jetzt nicht; es ist auch nicht geklärt, ob das Leben überhaupt auf unserer Erde selbst entstanden ist, oder vielleicht vom Weltraum auf die Erde gelangt ist – für beide Hypothesen gibt es Hinweise.

Es gab schon länger Überlegungen, auf den der Erde benachbarten Planeten Venus und Mars nach Lebensspuren zu suchen, da die Entstehung dieser Planeten im ungefähr gleichen Zeitraum erfolgte wie die der Erde, und die frühe geologische Vergangenheit dieser Himmelskörper wahrscheinlich recht ähnlich war. Die Experimente, die die Viking Landefahrzeuge der NASA 1976/77 auf der Oberfläche des Mars mit Marsboden durchführten, waren speziell auf den Nachweis von Mikroorganismen ausgerichtet. Zwar wurden die Ergebnisse dieser Experimente dann allgemein als negativ für das Vorliegen von Beweisen für mikrobiologische Aktivität beurteilt, und eine Zeitland waren wenig weitere Forschungspläne vorhanden. Dies änderte sich jedoch gründlich seit der Entdeckung von bakterien-ähnlichen Mikrofossilien im Meteorit ALH84001 (MCKAY et al. 1996), der nachweislich vom Mars stammt. Die Pläne zur Suche nach Leben auf dem Mars bestehen nun vorwiegend doch wieder im Auffinden von Mikroorganismen. Darüberhinaus wurden seit Sommer 2000 mit der Mars Orbiter Camera (MOC) besonders eindrucksvolle Bilder von Formationen auf der Marsoberfläche erhalten (http://www.msss.com/mars_images/index.html), die wie Rinnen, Kanäle und sedimentartig geschichtete Gesteine aussehen, und die auf das frühere oder vielleicht auch rezente Vorhandensein von Wasser schließen lassen. Die damit erhaltenen Informationen haben der Suche nach Leben auf dem Mars zusätzlich neuen Auftrieb gegeben.

Halit im Weltraum

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der bisherigen Berichte von extraterrestrischem Halit bzw. Hinweisen für Salzvorkommen. Die sogenannten SNC Meteoriten, die nach den Initialen der Fundorte Shergotty in Indien, Nakhla in Ägypten und Chassigny in Frankreich, benannt wurden, stammen vom Mars; sie enthalten Spuren von Halit, wie auch der Murchison-Meteorit und andere Chondriten. In Monahans in Texas fielen im Jahr 1998 mehrere Teile eines Meteoriten zur Erde und wurden kurz nach ihrem Aufprall untersucht. Sie enthielten ungewöhnlich große Halitkristalle von 1-3 mm Durchmesser, die mit bloßem Auge sichtbar waren, sowie Sylvit (KCl) und Wassereinschlüsse. Das Alter dieser Meteoriten wurde auf etwa 4,7 Milliarden Jahre bestimmt. Im Zag-Meteorit, der im Natural History Museum in London, England, deponiert war, wurden ebenfalls Halitkristalle entdeckt; die gleichzeitige Anwesenheit von bestimmten Xenon-Isotopen, die aus Jodisotopen entstehen, die es auf der Erde nicht gibt, bestätigte den extraterrestrischen Ursprung des Halits.

Die Galileo-Sonde, die den Jupitermond Europa umkreist, entdeckte mittels des an Bord vorhandenen Magnetometers Fluktuationen, die als magnetische Effekte von leitfähigen Strömungen nahe der Oberfläche interpretiert wurden – sehr wahrscheinlich aufgrund eines salzigen Ozeans.

Die beiden Mars-Fahrzeuge Spirit und Opportunity fanden Hinweise für laminierte Sedimente auf der Marsoberfläche, die die einstige „Uferlinie" eines alten Salzsees darstellen könnten. Die Elemente in Marsboden und -gesteinen, die mit dem Alpha-Partikel-Röntgenspektrometer bestimmt wurden, umfassen Na, Mg, Cl, und Br (RIEDER et al. 2004). Daher könnten gesättigte Salzlösungen, die einen stark erniedrigten Gefrierpunkt (gegenüber reinem Wasser) hätten, auf dem Mars vorhanden sein. Sie bräuchten nicht als Pfützen auf der Oberfläche existieren, sondern könnten in Gesteinsporen, zwischen Mineralkörnern, vorkommen, und sie könnten Lebensräume für Mikroorganismen darstellen.

Ausblick

Hohe Salzkonzentration sind für das Wachstum vieler Mikroorganismen kein Hindernis – ganz im Gegenteil: extrem halophile Bakterien, Archaea und auch manche einzelligen Algen gedeihen hervorragend in gesättigten Salzlösungen (JAVOR 1989). Optimales Wachstum kann bei Konzentrationen von 2,5 bis 5,2 M NaCl statt finden (KUSHNER & KAMEKURA 1988).

Halobakterien scheinen sehr lange Lebensfähigkeit in trockenen Umgebungen wie z. B. altem Steinsalz zu besitzen; weiters gibt es Halitfunde in außerirdischen

Proben. Daher erscheint es plausibel, bei der Suche nach Leben im Weltraum speziell eine Suche nach Halobakterien einzuplanen.

Um herauszufinden, ob Halobakterien überhaupt die Verhältnisse auf anderen Planeten wie dem Mars überleben könnten, haben wir begonnen, Experimente mit einer sogenannten Mars-Simulationskammer (Österreichische Akademie der Wissenschaften, Graz) durchzuführen. Dabei werden Mikroorganismen atmosphärischen Marsbedingungen ausgesetzt und anschließend auf Überlebensfähigkeit getestet (STAN-LOTTER et al. 2003). Dafür werden auch empfindliche Nachweismethoden wie die Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung mit LIVE/DEAD Farbstoffen eingesetzt.

Zusammenfassung

Aus permischem Steinsalz der Alpen und in England wurden lebensfähige Halobakterien (auch Haloarchaea genannt) isoliert, in Nährmedien kultiviert und mittels biochemischer, mikroskopischer und molekularbiologischer Methoden untersucht. Einige physiologische und molekulare Eigenschaften waren ähnlich zu denen bekannter Halobakterien; zahlreiche Unterschiede zeigten jedoch, dass es sich um neue Arten handelt. Diese Mikroorganismen könnten seit der Verdunstung der Urmeere, d. h. noch vor dem Auftreten der Dinosaurier, im Salz eingeschlossen überlebt haben.

Halobakterien gehören zu den extremophilen Mikroorganismen; sie besitzen ungewöhnliche Eigenschaften, wie optimales Wachstum bei Salzkonzentrationen bis zur Sättigung, auffallend rote, rosa oder purpurfarbige Pigmentierung, und möglicherweise extreme Langlebigkeit.

Auch im Weltraum wurde Salz in Form von Halit entdeckt, z. B. in Meteoriten vom Mars; weiter gibt es Hinweise auf das Vorhandensein von Salz auf der Marsoberfläche sowie, durch die Galileo-Sonde, auf salzige Wasservorkommen auf dem Jupitermond Europa. Daher wird die Suche nach extraterrestrischem Leben, die im 21. Jahrhundert von mehreren Weltraumbehörden durchgeführt werden wird, auch die Suche nach halophilen Mikroorganismen einschließen.

Danksagung

Allen gegenwärtigen und früheren Mitarbeiter/n/innen an den Universitäten Salzburg bzw. Wien danken wir für Mithilfe bei taxonomischen Untersuchungen von Halobakterien-Isolaten. HSL dankt dem Fonds zur Förderung der Wissenschaften, Wien, für Unterstützung der experimentellen Arbeiten (Projekte FWF P13995-MOB, P16260-B07 und P18256-B06), Mag. Michael Mayr, Salinen Austria, für die Hilfe beim Erhalt der Steinsalzproben sowie Prof. Gerhard Wanner, Universität München, und Chris Frethem, University of Minnesota, für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Literatur

BARBER D.J. (1981): Matrix phyllosilicates and associated minerals in C2M carbonaceous chondrites. — Geochim. Cosmochim. Acta **45**: 945-970.

DENNER E.B.M., MCGENITY T.J., BUSSE H.-J., WANNER G., GRANT W.D. & H. STAN-LOTTER (1994): *Halococcus salifodinae* sp.nov., an Archaeal isolate from an Austrian salt mine. — Int. J. System. Bacteriol. **44**: 774-780.

DOMBROWSKI H. (1963): Bacteria from Paleozoic salt deposits. — Ann. N.Y. Acad. Sci. **108**: 453-460.

FENDRIHAN S., LEGAT A., GRUBER C., PFAFFENHUEMER M., WEIDLER G., GERBL F. & H. STAN-LOTTER (2006): Extremely halophilic archaea and the issue of long term microbial survival. — Rev. Environ. Science Bio/tech. **5**, 1569-1605.

FREDRICKSON J.K. & T.C. ONSTOTT (2002): Leben im Tiefengestein. — Spektrum der Wissenschaft, Dossier **3**/2002: 16-21.

GEMMELL R.T., MCGENITY T.J. & W.D. GRANT (1998): Use of molecular techniques to investigate possible long-term dormancy of halobacteria in ancient halite deposits. — Ancient Biomol. **2**: 125-133.

GOODING J.L. (1992): Soil mineralogy and chemistry on Mars: Possible clues from salts and clays in SNC meteorites. — Icarus **99**: 28-41.

GRANT W.D., GEMMELL R.T. & T.J. MCGENITY (1998): Halobacteria – the evidence for longevity. — Extremophiles **2**: 279-288.

GRANT W.D., KAMEKURA M., MCGENITY T.J. & A. VENTOSA (2001): Class III. Halobacteria class. nov. — In: BOONE D.R., CASTENHOLZ R.W. & G.M. GARRITY (eds), Bergey's manual of systematic bacteriology, second ed., vol. **I**, Springer Verlag, New York: 294-301.

GRUBER C., LEGAT A., PFAFFENHUEMER M., RADAX C., WEIDLER G., BUSSE H.J. & H. STAN-LOTTER (2004): *Halobacterium noricense* sp.nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permo-Triassic salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *Halobacterium salinarum* and emended description of *Halobacterium salinarum*. — Extremophiles **8**: 431-439.

GUNDE-CIMERMAN N., OREN A. & A.PLEMENITAS (Eds; 2005): Adaptations to life at high salt concentrations in archaea, bacteria and eukarya. Vol 9. — In SECKBACH J. (Series Ed.): Cellular Origins, Life in Extreme Habitats and Astrobiology (COLE). Springer Verlag, Heidelberg, New York.

JAVOR B.J. (1989): Hypersaline Environments: Microbiology and Biogeochemistry. — Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

KLAUS W. (1963): Sporen aus dem südalpinen Perm (Vergleichsstudie für die Gliederung nordalpiner Salzserien). — Jb. Geol. B. A. Wien **106**: 229-364.

KUSHNER D.J. & M. KAMEKURA (1988): Physiology of halophilic eubacteria. — In: RODRIGUEZ-VALERA F. (Ed.), Halophilic Bacteria, Vol I, CRC Press Inc, Boca Raton: 109-140.

LEUKO S., LEGAT A., FENDRIHAN S. & H. STAN-LOTTER (2004): Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of environmental hypersaline samples. — Appl. Environ. Microbiol. **70**: 6884-6886.

MARGUET E. & P. FORTERRE (1998): Protection of DNA by salts against thermodegradation at temperatures typical for hyperthermophiles. — Extremophiles **2**: 115-122.

MCCORD T.B., MANSEN G.B., FANALE F.P., CARLSON R.W., MATSON D.L., JOHNSON T.V., SMYTHE W.D., CROWLEY J.K., MARTIN P.D., OCAMPO A., HIBBITTS C.A. & J.C. GRANAHAN (1998): Salts on Europa's surface detected by Galileo´s near Infrared Mapping Spectrometer. The NIMS team. — Science **280**: 1242-1245.

MCGENITY T.J., GEMMELL R.T., GRANT W.D. & H. STAN-LOTTER (2000): Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. — Environ. Microbiol. **2**: 243-250.

MCKAY D.S., GIBSON E.K. Jr., THOMAS-KEPRTA K.L., VALI H., ROMANEK C.S., CLEMETT S.J., CHILLIER X.D.F., MAECHLING C.R. & R.N. ZARE (1996): Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH 84001. — Science **273**: 924-930.

MORAN N.A., MUNSON M.A., BAUMANN P. & H. ISHIKAWA (1993): A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect host. — Proc. R. Soc. Lond. ser. B **253**: 167-171.

NG W.V., KENNEDY S.P., MAHAIRAS G.G., BERQUIST B., PAN M., SHUKLA H.D., LASKY S.R., BALIGA N.S., THORSSON V., SBROGNA J., SWARTZELL S., WEIR D., HALL J., DAHL T.A., WELTI R., GOO Y.A., LEITHAUSER B., KELLER K., CRUZ R., DANSON M.J., HOUGH D.W., MADDOCKS D.G., JABLONSKI P.E., KREBS M.P., ANGEVINE C.M., DALE H., ISENBARGER T.A., PECK R.F., POHLSCHRODER M, SPUDICH JL, JUNG K.W., ALAM M., FREITAS T., HOU S., DANIELS C.J., DENNIS P.P., OMER A.D., EBHARDT H., LOWE T.M., LIANG P., RILEY M., HOOD L. & S. DASSARMA (2000): Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 12176-12181.

PAK E. & O. SCHAUBERGER (1981): Die geologische Datierung der ostalpinen Salzlagerstätten mittels Schwefelisotopenuntersuchungen. — Verh. Geol. B.-A. **1981**: 185-192.

OREN A. (Ed.; 2002): Halophilic Microorganisms and their Environments. — Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

OREN A., VENTOSA A. & W.D. GRANT (1997): Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. — Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 233-236.

RADAX C., GRUBER G. & H. STAN-LOTTER (2001): Novel haloarchaeal 16S rRNA gene sequences from Alpine Permo-Triassic rock salt. — Extremophiles **5**: 221-228.

RIEDER R., GELLERT R., ANDERSON R.C., BRUCKNER J., CLARK B.C., DREIBUS G., ECONOMOU T., KLINGELHÖFER G., LUGMAIR G.W., MING D.W., SQUYRES S.W., D'USTON C., WÄNKE H., YEN A. & J. ZIPFEL (2004): Chemistry of rocks and soils at Meridiani Planum from the alpha particle X-ray spectrometer. — Science **306**:1746-1749.

ROEDDER E. (1984): The fluids in salt. — American Mineralogist **69**: 413-439.

STAN-LOTTER H. (2002): Mikroorganismen in permischen Salzsedimenten. — Spektrum der Wissenschaft, Dossier **3**/2002: 10-13.

STAN-LOTTER H., MCGENITY T.J., LEGAT A., DENNER E.B.M., GLASER K., STETTER K.O. & G. WANNER (1999): Very similar strains of *Halococcus salifodinae* are found in geographically separated Permo-Triassic salt deposits. — Microbiology **145**: 3565-3574.

STAN-LOTTER H., PFAFFENHUEMER M., LEGAT A., BUSSE H.J., RADAX C. & C. GRUBER (2002): *Halococcus dombrowskii* sp.nov., an archaeal isolate from a Permo-Triassic alpine salt deposit. — Int. J. System. Evol. Microbiol. **52**: 1807-1814.

STAN-LOTTER H., RADAX C., GRUBER C., LEGAT A., PFAFFENHUEMER M., WIELAND H., LEUKO S., WEIDLER G., KÖMLE N. & G. KARGL (2003): Astrobiology with haloarchaea from Permo-Triassic rock salt. — Int. J. Astrobiol. **1**: 271-284.

TOMLINSON G.A. & L.I. HOCHSTEIN (1976): *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. — Can. J. Microbiol. **22**: 587-591.

VENTOSA A (Ed.; 2004): Halophilic microorganisms. — Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

VREELAND R.H. & L.I. HOCHSTEIN (Eds; 1993): The biology of halophilic bacteria. — CRC Press, Boca Raton.

VREELAND R.H., STRAIGHT S., KRAMMES J., DOUGHERTY K., ROSENZWEIG W.D. & M. KAMEKURA (2002): *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. — Extremophiles **6**: 445-452.

WHITBY J., BURGESS R., TURNER G., GILMOUR J. & J. BRIDGES (2000): Extinct ^{129}I halite from a primitive meteorite: evidence for evaporite formation in the early solar system. — Science **288**: 1819-1821.

ZHARKOV M.A. (1981): History of Paleozoic Salt Accumulation. — Springer Verlag, Berlin.

ZOLENSKY M.E., BODNAR R.J., GIBSON E.K., NYQUIST L.E., REESE Y., SHIH C.Y. & H. WIESMAN (1999): Asteroidal water within fluid inclusion-bearing halite in an H5 chondrite, Monahans (1998). — Science **285**: 1377-1379.

Anschrift der Verfasser/innen:

Prof. Dr. Helga STAN-LOTTER
Dr. Sergiu FENDRIHAN
Mag. Andrea LEGAT
Mag. Marion PFAFFENHUEMER
Mag. Claudia GRUBER
Mag. Gerhard WEIDLER
Universität Salzburg
Fachbereich Molekulare Biologie
Abteilung Mikrobiologie
Billrothstraße 11
5020 Salzburg
Austria
E-Mail: helga.stan-lotter@sbg.ac.at